



Behörden-...

11

21

22

43

Offenlegungsschrift 25 46 699

Aktenzeichen:

P 25 46 699.3

Anmeldetag:

17. 10. 75

Offenlegungstag:

29. 4. 76

30

Unionspriorität:

32 33 31

18. 10. 74 Japan 120626-74

54

Bezeichnung:

Pullulansulfate und ihre Salze

71

Anmelder:

Sumitomo Chemical Co., Ltd., Osaka;
Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama (Japan)

74

Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr. rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

72

Erfinder:

Tsuji, Kozo, Takatsuki; Fujita, Fumio, Osaka;
Miyamoto, Masatoshi, Takatsuki; Kiso, Nao, Ibaraki; Aisaka, Akira,
Kawanishi (Japan)

2546699

u.Z.: L 473 (Vo/Wa/kä)
Case: A 1133-05

17. Oktober 1975

SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LTD.,
Osaka, Japan

und

HAYASHIBARA BIOCHEMICAL LABORATORIES, INC.
Okayama, Japan

" Pullulansulfate und ihre Salze "

Priorität: 18. Oktober 1974, Japan, Nr. 120 626 /74

Es ist bekannt, daß Polysaccharidsulfate zur Behandlung von Magengeschwüren eingesetzt werden können. Diese Verbindungen haben jedoch eine starke gerinnungshemmende Wirkung, so daß sie bei Magenblutungen nicht verwendet werden können.

Die bekannten Polysaccharidsulfate, die sich als Arzneistoffe zur Behandlung von Magengeschwüren eignen, müssen soweit sulfoniert werden, daß sie etwa 12 bis 18 Gewichtsprozent Schwefel enthalten. Dies erfordert scharfe Reaktionsbedingungen und lange Reaktionszeiten.

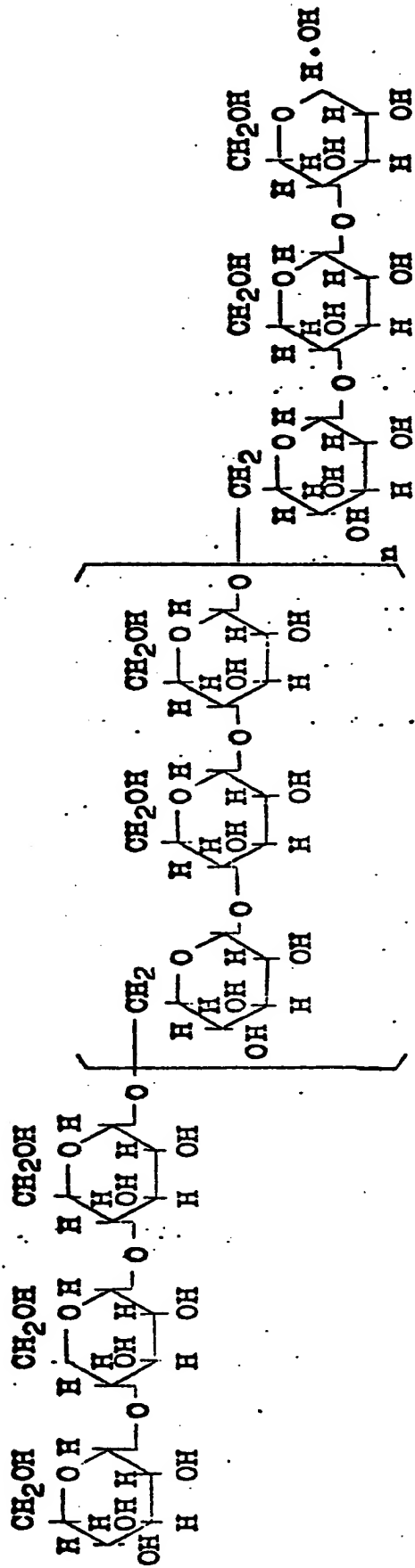
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Pullulansulfate und ihre Salze sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung zu schaffen, die/zur Behandlung von Magengeschwüren eignen und sich

eine niedrige gerinnungshemmende Wirkung besitzen.

Die Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst. Die Erfindung betrifft somit den in den Ansprüchen gekennzeichneten Gegenstand.

Die Salze sind vorzugsweise die Alkalisalze, wie die Natrium- und Kaliumsalze, die Erdalkalisalze, wie die Magnesium- und Calciumsalze, Ammoniumsalze, Aluminiumsalze und die entsprechenden gemischten Salze.

Das verfahrensgemäß eingesetzte Pullulan ist ein lineares Hochpolymer aus α -1,6-verknüpfter Maltotriose, einem Trimeren der Glucose. Es hat folgende Strukturformel:



n bedeutet den Polymerisationsgrad und hat einen Wert von 20 bis 10 000.

Pullulan läßt sich aufgrund seiner chemischen Struktur und Eigenschaften nicht mit Stärke, löslicher Stärke, oxidierten Stärke, Dextrin, Dialdehydstärke, verätherter Stärke, kationisierter Stärke, Cellulose, Alkylcellulosen, Hydroxyalkylcellulosen, Carboxymethylcellulose und Gummi arabicum vergleichen, die ebenso wie Pullulan zur Hauptsache aus Glucoseeinheiten bestehen. Beispielsweise ist Pullulan in kaltem Wasser leicht löslich, seine wäßrige Lösung ist über lange Zeit stabil und es erfolgt keine Gelierung.

Die Pullulansulfate können durch Umsetzen von Pullulan mit einem Sulfonierungsmittel und gegebenenfalls anschließende Neutralisation des entstandenen Schwefelsäureesters mit einer Base hergestellt werden.

Die bekannten Polysaccharidsulfate und ihre Salze, die sich zur Behandlung von Magengeschwüren eignen, müssen soweit sulfoniert werden, daß sie mindestens 12 Gewichtsprozent Schwefel enthalten. Dagegen können die erfindungsgemäßen Pullulansulfate und ihre Salze zur Behandlung von Magengeschwüren eingesetzt werden, wenn ihr Sulfonierungsgrad einem Schwefelgehalt von 4 Gewichtsprozent oder mehr entspricht. Daher können nach dem erfindungsgemäßen Verfahren die Pullulansulfate unter milden Bedingungen sulfoniert werden. Dabei erfolgt praktisch keine Zersetzung des Pullulans und des Umsetzungsproduktes.

Das verfahrensgemäß eingesetzte Pullulan kann beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß man einen Stamm der Art *Pullularia pullulans* 5 Tage bei 24°C in einem Nährmedium unter Schütteln züchtet, das 10 % Stärkesirup (D.E. 42) oder Glucose, 0,5 % K_2HPO_4 , 0,1 % NaCl, 0,02 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,06 % Ammoniumsulfat und 0,04 % Hefeextrakt enthält. Dabei wird Pullulan als klebrige Substanz erhalten, die von den Zellen in die Kulturflüssigkeit abgeschieden wird. Sofern erforderlich, wird die Kulturbrühe von den Zellen durch Zentrifugieren abgetrennt und der Überstand mit Methanol versetzt. Die entstandene Pullulanfällung kann hierauf mehrmals in Wasser gelöst und mit Methanol wieder ausgefällt werden. Dadurch wird ein gereinigtes Pullulan erhalten.

Die physikalischen Eigenschaften des erhaltenen Pullulans hängen in gewissem Ausmaß von der Art des eingesetzten Stammes ab. Erfindungsgemäß kann jedoch Pullulan verwendet werden, das aus jedem pullulanbildenden Stamm erhalten wurde. Das Molekulargewicht des erfindungsgemäß verwendeten Pullulans kann in einem verhältnismäßig breiten Bereich liegen. Vorzugsweise beträgt es 10 000 bis 5 000 000.

Die Sulfonierung kann nach beliebigen herkömmlichen Verfahren durchgeführt werden. Beispielsweise werden Pullulansulfate durch Umsetzung von Pullulan mit einem Sulfonierungsmittel, wie Chlorsulfonsäure, Schwefeltrioxid oder einem Schwefeltrioxid-Pyridinkomplex, in Gegenwart eines Lösungsmittels, wie Pyridin, Dimethylformamid, Formamid, Chloroform oder flüssigem Schwefel-

dioxid, erhalten. Man arbeitet mit einem Sulfonierungsmittel, wie Chlorsulfonsäure in stark alkalischem Bereich, oder mit konzentrierter Schwefelsäure, wobei die primären und sekundären Hydroxylgruppen des Pullulans sulfoniert werden.

Die Menge des Sulfonierungsmittels beträgt im erfindungsgemäßen Verfahren mindestens 0,3 Mol, vorzugsweise 0,3 bis 20 Mol, pro Mol Glucoseeinheit des Pullulans.

Die Reaktionstemperatur und -zeit für die Sulfonierung sind nicht genau festgelegt, richten sich aber vorzugsweise nach der Art des verwendeten Sulfonierungsmittels. Wird beispielsweise Pullulan mit Chlorsulfonsäure, Schwefeltrioxid oder einem Schwefeltrioxid-Pyridinkomplex in Gegenwart eines Lösungsmittels, wie Pyridin, Dimethylformamid, Formamid oder Chloroform, umgesetzt, dann wird die Umsetzung vorzugsweise 1 bis 36 Stunden bei 0° bis 80°C durchgeführt. Werden flüssiges Schwefeldioxid und Schwefeltrioxid oder Chlorsulfonsäure verwendet, so wird die Reaktion vorzugsweise 1 bis 36 Stunden bei -15° bis -30°C durchgeführt. Bei Verwendung konzentrierter Schwefelsäure wird die Umsetzung vorzugsweise 1 bis 36 Stunden bei -50° bis +10°C durchgeführt. Wird die Umsetzung längere Zeit bei höheren Temperaturen als angegeben durchgeführt, so treten Nebenreaktionen, wie Abbau des Pullulans oder Desulfonierung von Reaktionsprodukten auf. Dies beeinflusst die Ausbeute und den Sulfonierungsgrad.

Das so erhaltene Pullulansulfat wird in Wasser gelöst und in die Salzform übergeführt. Der Ester wird in einer wäßrigen Lösung von beispielsweise Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Calciumhydroxid, Magnesiumhydroxid oder Bariumhydroxid gelöst, so daß die Lösung einen pH-Wert von 7 bis 12 hat. Anschließend wird die Lösung in Methanol, Äthanol, Aceton oder ein ähnliches, mit der wäßrigen Lösung mischbares organisches Lösungsmittel gegossen, wobei ein weißer Niederschlag des Natrium-, Kalium-, Calcium-, Magnesium- oder Bariumsalzes des Pullulansulfats erhalten wird.

Anschließend kann das Pullulansulfat oder das erhaltene Natrium-, Kalium-, Calcium-, Magnesium- oder Bariumsalz in Wasser gelöst und diese Lösung einer weiteren Lösung zugesetzt werden, die durch Umsetzen einer Säure oder Lauge mit Aluminiummetall oder einem Aluminiumsalz, wie Aluminiumhydroxid, Aluminiumchlorid, Aluminiumsulfat oder Aluminiumdihydroxychlorid, hergestellt worden ist. Der pH-Wert der Lösung wird dabei auf etwa 3,3 bis 6,0 eingestellt. Es fällt das Aluminiumsalz des Pullulansulfats als weißer Niederschlag aus.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann Pullulansulfat oder sein wasserlösliches Natrium-, Kalium- oder Calciumsalz in Wasser gelöst und mit einer Aluminiumionen enthaltenden wäßrigen Lösung versetzt werden, die durch Umsetzung einer Säure oder Lauge mit Aluminiummetall oder einem Aluminiumsalz, wie Aluminiumhydroxid, Aluminiumchlorid oder Aluminiumsulfat hergestellt worden ist. Die Lösung wird auf einen pH-Wert von

etwa 3,3 bis 6,0 eingestellt. Sodann wird die Lösung mit einer Magnesiumionen enthaltenden wäßrigen Lösung versetzt, die durch Umsetzung einer Säure oder Base mit Magnesiummetall oder einem Magnesiumsalz, wie Magnesiumhydroxid, Magnesiumchlorid oder Magnesiumsulfat erhalten worden ist. Der pH-Wert der Lösung wird auf 3,3 bis 6,0 eingestellt. Es fällt das gemischte Aluminium-Magnesiumsalz des Pullulansulfats aus.

Die erfindungsgemäß hergestellten Pullulansulfate und ihre Salze enthalten 5 bis 20 Gewichtsprozent Schwefel. Ihre blutgerinnungshemmende Wirkung wurde mit Hilfe der Methode der quantitativen Heparinbestimmung und nach dem japanischen Arzneibuch bestimmt und betrug $1/30$ bis $1/7$ der Wirkung eines Standard-Heparinprodukts. Das ist für ein Polysaccharidsulfat ein niedriger Wert.

Die Pullulansulfate der Erfindung und ihre Salze eignen sich hervorragend zur Behandlung von Magengeschwüren. Beispielsweise wurden Natriumsalze der Pullulansulfate aus den nachstehend beschriebenen Beispielen hinsichtlich ihrer Hemmung der proteolytischen Aktivität von Pepsin in vitro mit dem Natriumsalz des Heparins, dem Natriumsalz von Dextransulfat und dem Aluminiumsalz des Sucrosesulfats verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I

- 9 -

untersuchte Verbindung	Schwefel- gehalt, %	Restaktivität des Pepsins, %			Menge der Verbindung zur Einstel- lung der Akti- vität auf 60 %
		1 mg/ml	3 mg/ml	5 mg/ml	
Natriumsalz des Heparins	11,3	78,8	42,3	26,7	2,0
Natriumsalz des Dextransulfats	17,8	59,6	9,6	11,1	1,0
Aluminiumsalz des Sucrose- sulfats	(10)	82,6	70,1	51,5	4,1
Natriumsalz des Pullulansulfats (Beispiel 1)	7,7	80,9	43,9	16,6	2,1
(" 2)	15,0	60,3	13,9	8,5	1,0
(" 3)	12,6	55,2	8,2	7,8	0,8
(" 4)	10,7	56,3	4,9	10,3	0,8

609818/0999

2546699

Auch die Natriumsalze des Pullulansulfats mit niedrigem Schwefelgehalt zeigen eine starke Wirkung.

Die Hemmung der proteolytischen Aktivität des Pepsins wurde folgendermaßen bestimmt:

1 ml einer 1 mg/ml Pepsin enthaltenden wäßrigen Lösung, die mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 1,6 eingestellt wurde, 1 ml einer 1, 3 oder 5 mg/ml einer wäßrigen Lösung der zu untersuchenden Verbindung, die mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 1,6 eingestellt wurde oder 1 ml Salzsäure mit einem pH-Wert von 1,6 als Kontrolle werden 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1 ml einer 2prozentigen wäßrigen Caseinlösung, die mit Salzsäure auf einen pH-Wert 1,6/eingestellt wurde, ^{von} versetzt. Die erhaltene Lösung wird genau 20 Minuten inkubiert. Dann werden 10 ml 0,4 molare Trichloressigsäure zum Abbruch der Reaktion zugesetzt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, und 1 ml des Filtrats wird mit 5 ml einer 0,4 molaren Natriumcarbonatlösung und 1 ml Phenolreagens versetzt (1→5). Das erhaltene Gemisch wird 20 Minuten bei 37°C inkubiert, sodann abgekühlt und die Absorption bei 660 mμ gemessen. Als Nullstelle für den gemessenen Wert wird der Wert jeder der genannten Lösungen benutzt, die mit der 0,4 molaren Trichloressigsäure vor Zusetzen der 2prozentigen Caseinlösung ^{sich} vermischt worden waren und/dann auf die vorgenannte Weise farblich entwickelt. Aus der Absorption des die zu untersuchende Verbindung enthaltenden Gemisches kann die Restaktivität des Pepsins des Gemisches berechnet und in Prozent angegeben werden, wenn man als 100 % Pepsinaktivität die Absorption der Kontrollprobe ansetzt.

Die Pullulansulfate und ihre Salze können mit anderen Arzneistoffen zur Behandlung von Magengeschwüren kombiniert werden, z.B. mit ZNS-dämpfenden Verbindungen, wie Tranquillizern, Anticholinergika, Antacida, Pepsininhibitoren und Schutzmitteln für die Magenschleimhaut.

Die erfindungsgemäß hergestellten Pullulansulfate können außerdem als Zusatzstoffe für Nahrungsmittel, als Ionenaustauscher oder Schlichtemittel verwendet werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

B e i s p i e l 1

Eine Dispersion von 25 g Pullulan (Molekulargewicht 150 000) in 300 ml Pyridin wird bei 20°C unter Rühren allmählich mit 75 ml Chlorsulfonsäure versetzt. Danach wird das Gemisch noch 4 Stunden bei 25°C gerührt und hierauf in 350 ml kaltem Wasser gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit 1 n Natronlauge auf einen pH-Wert von 7 bis 10 eingestellt. Es bildet sich ein Natriumsalz. Die Lösung wird in einen Cellophanschlauch gefüllt und gegen Wasser dialysiert. Sodann wird der Inhalt des Cellophanschlauches in 2 Liter Methanol gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abgetrennt und getrocknet. Ausbeute 29,3 g eines Natriumsalzes des Pullulansulfats mit 7,7 Gewichtsprozent Schwefel.

B e i s p i e l 2

300 ml Pyridin werden langsam bei 20°C unter Rühren mit 75 ml Chlorsulfonsäure versetzt. Sodann wird die Lösung unter Rühren bei 70°C langsam mit 25 g Pullulan (Molekulargewicht 10 000) versetzt. Das Gemisch wird unter Rühren 4 Stunden bei 70°C umgesetzt. Anschließend wird gemäß Beispiel 1 aufgearbeitet. Ausbeute 66,4 g eines Natriumsalzes des Pullulansulfats mit 15 Gewichtsprozent Schwefel.

B e i s p i e l 3

Beispiel 2 wird wiederholt, jedoch wird das Pullulan mit dem Molekulargewicht 10.000 durch ein Pullulan mit dem Molekulargewicht 89.000 ersetzt. Man erhält 58,9 g eines Natriumsalzes des Pullulansulfats mit 12,6 Gewichtsprozent Schwefel.

B e i s p i e l 4

Beispiel 2 wird wiederholt, jedoch wird das Pullulan mit dem Molekulargewicht 10 000 durch Pullulan mit einem Molekulargewicht von 140 000 ersetzt. Ausbeute 62,7 g eines Natriumsalzes des Pullulansulfats mit 10,7 Gewichtsprozent Schwefel.

B e i s p i e l 5

750 g mit einer Aceton-Trockeneis-Mischung auf -40°C gekühltes flüssiges Schwefeldioxid werden mit 35 g Schwefeltrioxid und 10 g Pullulan versetzt. Das Gemisch wird 10 Stunden bei -20° bis -15°C gerührt und anschließend 18 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Während dieser Zeit verdampft das Schwefeldioxid. Der Rückstand wird abfiltriert und in 150 ml kaltem Wasser gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit Natronlauge auf

einen pH-Wert von 10 eingestellt und filtriert. Anschließend wird das Filtrat in 1 Liter Methanol gegeben. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Ausbeute 16,3 g eines Natriumsalzes des Pullulansulfats mit 18,5 Gewichtsprozent Schwefel.

B e i s p i e l 6

Eine Dispersion von 10 g Pullulan (Molekulargewicht 150 000) in 100 ml Pyridin wird bei 50°C unter Rühren allmählich mit 40 g eines Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplexes versetzt. Das erhaltene Gemisch wird sodann auf 60°C erwärmt und gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsprodukt mit Eis gekühlt, um das Pyridin abzutrennen. Der erhaltene geleeartige Niederschlag wird in kaltem Wasser gelöst, die erhaltene Lösung mit 1 n Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit wird eingeengt und in 1 Liter Äthanol gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Ausbeute 26 g eines Natriumsalzes des Pullulansulfats mit 17,3 Gewichtsprozent Schwefel.

B e i s p i e l 7

10 g Pullulan (Molekulargewicht 89 000) werden in 80 ml 95prozentige, auf -5°C gekühlte, konzentrierte Schwefelsäure eingetragen. Das erhaltene Gemisch wird 2 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Sodann werden 300 ml Diäthyläther unter Kühlung derart zugesetzt, daß die Temperatur 10°C nicht überschreitet. Das Reaktionsprodukt fällt als Niederschlag aus. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Diäthyläther gewaschen. Das er-

haltene weiße Pulver wird in 100 g Eiswasser gelöst und mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Anschließend werden unlösliche Bestandteile abfiltriert und das Filtrat dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit wird in 500 ml Äthanol gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Ausbeute 7,6 g eines Natriumsalzes des Pullulansulfats mit 4,0 Gewichtsprozent Schwefel.

B e i s p i e l 8

Eine Lösung von 10 g des gemäß Beispiel 3 erhaltenen Natriumsalzes von Pullulansulfat, wird allmählich unter Rühren mit einer Lösung versetzt, die durch Auflösen der durch Umsetzen von 1 Mol Aluminiumhydroxid mit 0,5 Mol Salzsäure erhaltenen Verbindung in 500 ml Wasser hergestellt wurde. Die erhaltene Lösung wird sofort trübe und es bildet sich ein Niederschlag. Der pH-Wert der Lösung beträgt 4,8. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und der Niederschlag abschließend abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Ausbeute 12,4 g eines Aluminiumsalzes des Pullulansulfats, das 12,7 Gewichtsprozent Aluminium und 8,8 Gewichtsprozent Schwefel enthält.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Pullulansulfate und ihre Salze.
2. Pullulansulfate und ihre Salze mit 5 bis 20 Gewichtsprozent Schwefel.
3. Pullulansulfate und ihre Salze mit Molekulargewichten von 10 000 bis 5 000 000 des Pullulans.
4. Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium-, Ammonium- und Aluminium-Pullulansulfat sowie die entsprechenden gemischten Salze.
5. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Pullulan, gegebenenfalls in Gegenwart eines Lösungsmittels, mit einem Sulfonierungsmittel behandelt, und gegebenenfalls durch Umsetzung mit einer Base in ein Salz überführt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Lösungsmittel Pyridin, Dimethylformamid oder Chloroform und als Sulfonierungsmittel Chlorsulfonsäure, Schwefeltrioxid oder einen Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sulfonierung 1 bis 36 Stunden bei Temperaturen von 0° bis 80°C durchführt.

8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Lösungsmittel flüssiges Schwefeldioxid und als Sulfonierungsmittel Schwefeltrioxid oder Chlorsulfonsäure verwendet.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sulfonierung 1 bis 36 Stunden bei Temperaturen von -15° bis -30°C durchführt.
10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Sulfonierungsmittel Schwefelsäure verwendet.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sulfonierung 1 bis 36 Stunden bei Temperaturen von -50° bis 10°C durchführt.
12. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man das Sulfonierungsmittel in einem Mengenverhältnis von 0,3 bis 20 Mol pro Mol Glucoseeinheit des Pullulans einsetzt.
13. Arzneimittel, bestehend aus mindestens einer Verbindung gemäß Anspruch 1 bis 4 und üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln und/oder Hilfsstoffen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)